

Revisão de Artigo

Avanços em Imunologia

Ian R. Mackray, M.D., e Fred S. Rosen, M.D.,
Editores

VACINAS E VACINAÇÃO

Gordon Ada, D.Sc*

Mais de 70 bactérias, vírus, parasitas e fungos são graves patógenos para o homem.¹ Vacinas estão disponíveis contra alguns desses agentes e estão sendo desenvolvidas contra quase todas as outras bactérias e vírus e cerca de metade dos parasitas. A Tabela 1 lista as infecções para as quais existem atualmente vacinas licenciadas e aquelas para as quais uma vacina candidata está em desenvolvimento a fase 3 do teste clínico,² indicando que a vacina provavelmente será licenciada dentro de 5 a 10 anos.

Tradicionalmente, as vacinas atenuadas eram feitas por passagens repetidas do agente infeccioso em cultura tissular ou em animais hospedeiros até que sua virulência fosse bastante diminuída, porém sua imunogenicidade era retida. Alternativamente, agentes químicos como a formalina foram usados para destruir a infectividade. Mais recentemente, parte de um agente infeccioso, usualmente um antígeno de superfície, tem sido usado como uma vacina de subunidade. As vacinas atuais contra o vírus da hepatite B e doença de Lyme confiam na tecnologia do DNA-recombinante. As toxinas bacterianas são transformadas em não tóxicas por tratamento químico, o toxóide resultante protege contra o agente infeccioso. A proteção contra alguns tipos de bactéria encapsulada tem sido alcançada pela imunização com um oligossacarídeo ou polissacarídeo capsular, porém estes antígenos independentes de célula T induzem apenas anticorpos IgM, os quais são protetores fracos na infância. A conjugação desse sacarídeo a uma proteína ou complexo proteico induz anticorpos IgG porque as células T reconhecem o complexo de um peptídeo com um complexo molecular histocompatível principal na célula que apresenta o antígeno (Fig 1). As vacinas conjugadas contra o *Haemophilus influenzae* tipo b também induzem imunidade mucosa, a qual reduz a presença de bactéria na mucosa nasal. Tais conjugados protegem os menores de 1 ano de idade com muita efetividade.

EFICÁCIA DE ALGUMAS VACINAS INFANTIS

Os registros mantidos pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) desde 1912 revelam o número de casos notificados de uma doença infecciosa antes e após a vacina se tornar disponível.⁴ A redução é marcante: 100 por cento no caso de poliomielite natural (o último caso nas Américas foi no Peru em 1992); cerca de 99 por cento no caso da difteria, sarampo, caxumba e rubéola; e cerca de 97 por cento no caso de coqueluche (causada pela *Bordetella pertussis*). Todos esses agentes passam por alguma variação antigênica (ou tendência) ou nenhum, mostrando que sob condições virtuais ideais, a vacinação pode ser extraordinariamente efetiva.⁴

* Da Escola John Curtin para Pesquisa Médica, Universidade Nacional Australiana, Canberra, Austrália. Enviar solicitação de reimpressos para Dr. Ada na Escola John Curtin para Pesquisa Médica, Universidade Nacional Australiana, Box 334, ACT 2601 Canberra, Austrália.

TABELA 1. VACINAS CONTRA PATÓGENOS AO HOMEM

Agente Infeccioso	Situação da vacina*	Doença	Tipo de Vacina Tradicional	Uso ou População Alvo
Bactéria				
<i>Bacillus anthracis</i>	Disponível	Anthrax	Inativada	Para limitar guerra biológica
<i>Bordetella pertussis</i>	Disponível	Coqueluche	Inativada, sub unidade	Crianças e Adultos
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Disponível	Doença de Lyme	Sub unidade	Residentes de áreas endêmicas nos Estados Unidos
<i>Clostridium tetani</i>	Disponível	Tétano	Toxóide	Crianças
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Disponível	Difteria	Toxóide	Crianças
<i>Coxiella burnetii</i>	Disponível	Febre grave (febre Q)	Inativada	Trabalhadores de matadouros e indústrias de processamento de alimento
<i>Haemophilus influenzae</i>	Disponível	Meningite, epiglote, pneumonia tipo b	Conjugada	Crianças
<i>Mycobacterium leprae</i>	Fase 3 teste clínico	Lepra	Inativada	Residentes de áreas endêmicas
<i>M. tuberculosis</i>	Disponível	Tuberculose	Vivo atenuada	Todas as pessoas
<i>Neisseria meningitidis</i>				
Sorogrupo B	Fase 3 teste clínico	Meningite	Subunidade, conjugada	Crianças
Sorogrupo C	Disponível	Meningite	Conjugada	
<i>Salmonella typhi</i>	Disponível (Ty21)	Febre tifóide	Viva atenuada, polissacarídeo	Residentes de ou viajantes para áreas de endemia, crianças
	Fase 3 teste clínico	Febre tifóide	Conjugada	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Fase 3 teste clínico	Impetigo, síndrome do choque tóxico em mulheres	Conjugada	Aquelas sob alto risco, aquelas com exzema, aquelas com disfunção neutrófila
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Disponível	Pneumonia, otite média, meningite	Conjugada	Pessoas idosas
<i>Vibrio cholerae</i>	Disponível	Cólera	Viva atenuada, inativado	Residentes ou viajantes á áreas de endemia
Vírus				
Adenovírus	Disponível	Doença respiratória	Viva atenuada	Militares
Hepatite A	Disponível	Doença hepática, câncer	Viva atenuada, inativada	Residentes ou viajantes á áreas de endemia
Influenzavírus				
A	Disponível	Doença respiratória	Viva atenuada, inativada, sub unidade	Crianças (apenas vacina de vírus vivo), pessoas idosas
B	Fase 3 teste clínico			
Vírus da encefalite japonesa	Disponível	Infecção cerebral	Inativada	Residentes ou viajantes á áreas de endemia
Vírus do sarampo	Disponível	Infecção do trato respiratório, PEES†	Viva atenuada	Crianças e adolescentes
Vírus da caxumba	Disponível	Caxumba, meningite, orquite	Viva atenuada	Crianças e adolescentes
Poliovírus	Disponível	Poliomielite, paralisia	Viva atenuada, inativada	Crianças
Vírus da raiva	Disponível	Raiva	Inativada	Pessoas expostas, residentes em áreas endêmicas
Vírus da rubéola	Disponível	Sarampo alemão, malformações fetais	Viva atenuada	Crianças
Vírus da Vaccinia	Disponível	Varíola	Viva atenuada	Trabalhadores de laboratório
Vírus varicela-zoster	Disponível	Varicela	Viva atenuada	Crianças
Vírus da febre amarela	Disponível	Icterícia, falência hepática e renal	Viva atenuada	Residentes em áreas endêmicas, em especial crianças
Parasitas				
Leishmania	Teste clínico fase 3	Calazar	Viva atenuada, inativada	Residentes de países onde a doença é endêmica
Fungo				
<i>Coccidioides immitis</i>	Teste clínico fase 3	Infecção pulmonar	Inativada	Residentes de países onde a doença é endêmica

* Vacinas que estão sendo avaliadas no teste clínico fase 3 devem estar disponíveis em 5 a 10 anos.

† PEES significa pancefalite esclerosante subaguda.

Dentro de um ano após a introdução em 1999 de uma vacina conjugada contra *Neisseria meningitidis* sorogrupo C no Reino Unido, a incidência de meningite foi

reduzida cerca de 92 por cento entre as crianças jovens e cerca de 95 por cento entre os adolescentes.⁵ Uma vacina conjugada contra *Salmonella typhi* Vi (Vi-rEPA) reduziu a incidência de febre tifóide entre crianças de dois-a-quatro anos de idade em mais de 90 por cento.⁶ Ambos os achados confirmam a efetividade marcante das vacinas conjugadas.

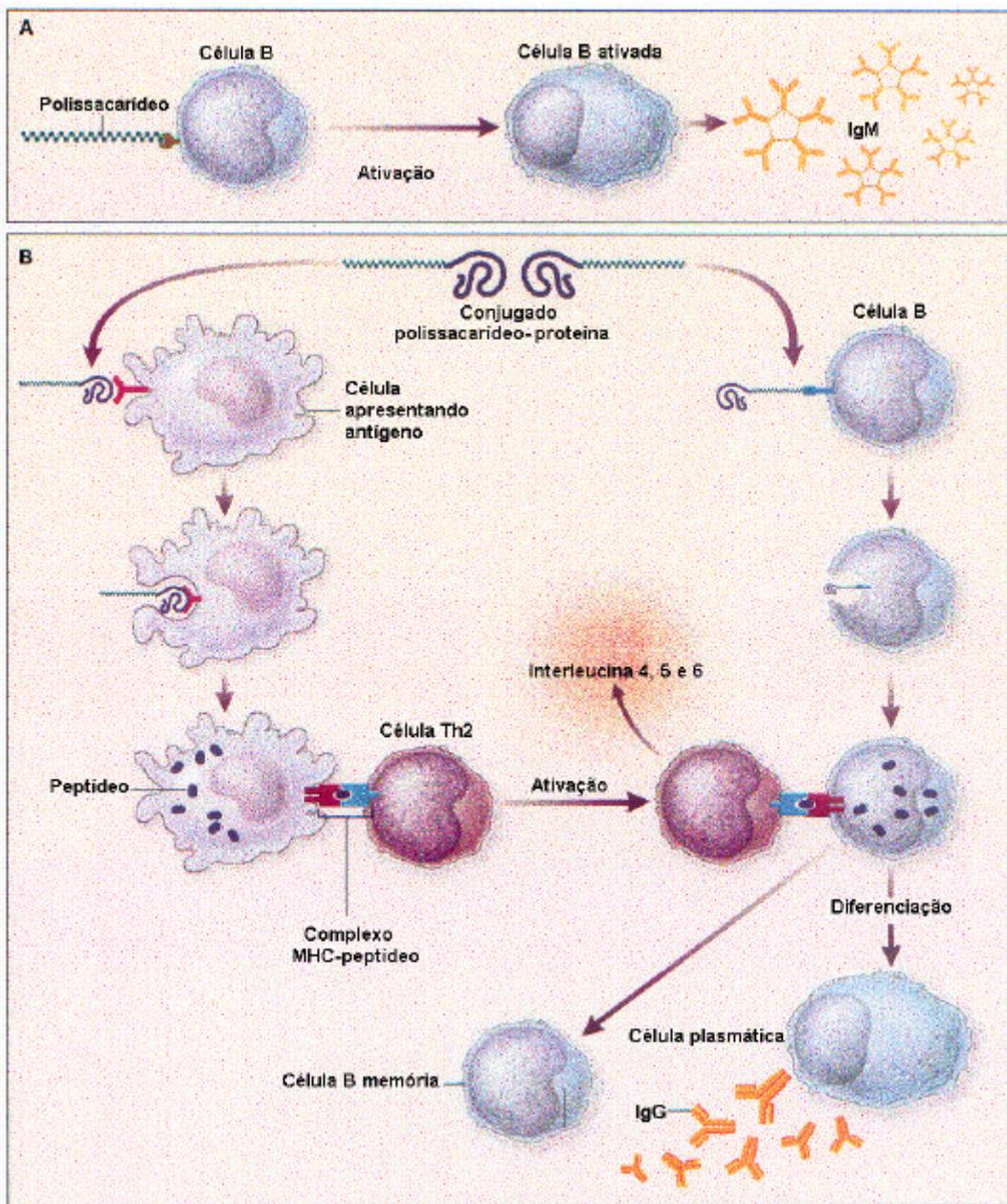


Figura 1. Respostas de anticorpos a Conjugados de antígenos polissacarídeo e polissacarídeo-proteína. No Painel A, um antígeno polissacarídeo se liga a um receptor IgM na superfície de uma célula B no tecido linfóide. Uma vez as células B ativadas, elas produzem e então secretam moléculas de anticorpo IgM. Os segmentos Fab individuais da molécula IgM têm apenas uma afinidade moderada, porém devido a existência de 10 segmentos, uma molécula IgM tem uma alta avidéz. Em contraste, no Painel B, alguns conjugados de polissacarídeo-proteína, serão apreendidos por células dendríticas, as quais apresentam peptídeos da porção proteica do conjugado a células T helper do tipo 2 (Th2). Outras moléculas conjugadas se ligam a células B que têm receptores IgM específicos para carboidrato e suportarão endocitose e serão processados pela célula B; os peptídeos resultantes serão expressos com moléculas MHC classe II na superfície da célula B. Este complexo é reconhecido pela célula Th2 ativada, a qual então secreta interleucina-4, interleucina-5 e interleucina-6. Isto faz a diferenciação da célula B e expressa moléculas IgG com especificidade polissacarídica. Essas células maturam nos folículos linfóides; apenas células que expressam moléculas IgG de afinidade muito alta tornam-se células plasmáticas e secretam IgG de alta afinidade que se ligam fortemente a bactéria encapsulada e mediam atividade opsonica e atividades bactericidas mediadas por complemento. Um estudo recente³ sugere que a formação de células B memória é um componente crítico para imunidade protetora contra infecção por *Haemophilus influenzae* tipo b.

A experiência com o sarampo nos Estados Unidos é de interesse. De 1912 até 1963, a incidência nunca caiu abaixo de 100.000 casos por ano, e as epidemias eram comuns. Após a introdução da primeira vacina em 1963, o número de casos caiu para níveis muito baixos e permaneceu assim até 1990, quando ocorreu uma epidemia durando três anos e envolvendo aproximadamente 18.000 pacientes, a maioria dos quais eram adolescentes ou adultos jovens. Esse ressurgimento foi devido a vacinação inadequada desses pacientes na faixa etária de um a dois anos nas principais áreas urbanas. O reconhecimento de que a imunidade pode diminuir após a vacinação levou a um esquema de duas doses de vacina, o que preveniu a transmissão de infecções naturais do sarampo dentro dos Estados Unidos, Canadá e Finlândia.

Algumas vezes, a vacina pode falhar, indicando que induziu a uma resposta imunológica sub-ideal. A falha na resposta ou um baixo nível de resposta a uma vacinação única, tal como a vacina contra hepatite B, pode ser evitada pela adição de epítopos de células T-helper à vacina.⁷ No caso do vírus varicella-zoster, como outros vírus, os quais induzem infecções latentes, uma vacina de vírus vivo atenuado pode não eliminar a infecção porém previne a varicela.

SEGURANÇA DAS VACINAS

Os eventos adversos associados com as vacinas infantis são algumas vezes agrupadas como reações precoces e tardias. As reações dentro das primeiras 24 horas incluem eritema e edema no local da injeção, febre, choro prolongado, síncope, convulsões e raramente, episódios hipotônico hiporresponsivos ou anafilaxia. As reações que ocorrem dentro de poucas semanas após a vacinação incluem encefalite e encefalopatia e algumas vezes leva a danos cerebrais clinicamente significativos.

No Reino Unido na década de 1970, temores de que a vacina de célula inteira contra pertussis induzia dano cerebral causou queda nos níveis de vacinação em aproximadamente 30 por cento. Dois surtos subsequentes de coqueluche causaram mais de 30 mortes, e muitas das crianças infectadas sofreram danos cerebrais.⁸ Uma revisão subsequente da evidência falhou em substanciar a associação entre a vacina e o dano cerebral.

A evidência de uma reação adversa pode surgir apenas após a vacina ter sido licenciada. Isto foi o caso da vacina contra rotavírus nos Estados Unidos, a qual foi associada com uma alta incidência inaceitável de intusseção.⁹ Uma encefalopatia desmielinizante ocorre após a vacinação contra o sarampo em cerca de 1 em um milhão de receptores; a incidência desta complicação após a infecção natural do sarampo é de 1 por 1000.¹⁰ A incidência de panencefalite esclerosante subaguda, na qual o vírus do sarampo está diretamente envolvido, diminuiu cerca de, no mínimo, 90 por cento após a vacinação contra o sarampo tornar-se ampla. A síndrome de Guillain-Barré se desenvolve em cerca de 1 em um milhão de receptores da vacina contra a influenza.

A vacina oral contra pólio erradicou a poliomielite das Américas, porém nos Estados Unidos, a vacina causou cerca de 1 caso de paralisia em um vacinado ou contato próximo por milhão de doses de vacina, como resultado da reversão da cepa do vírus tipo 3 usada na vacina para virulência. O Comitê Consultivo em Práticas de Imunizações do CDC e a Academia Americana de Pediatria recomendou que apenas a vacina inativada contra poliomielite fosse usada após 1 de janeiro de 2000.¹¹

Em geral, não existe confirmação científica ou evidência clínica de que a administração de qualquer vacina cause uma alergia específica, asma, autismo, esclerose múltipla, ou a síndrome da morte súbita infantil. Um relatório citado

amplamente alegou uma associação entre a vacinação contra o sarampo (usualmente com vacina contra sarampo, caxumba e rubéola) e a subsequente ocorrência de doença intestinal inflamatória ou autismo.¹² Pelo menos 10 estudos^{13,14} não encontraram evidência para substanciar uma associação.

DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DA VACINA

Quatro condições são essenciais para o sucesso de um programa de erradicação baseado em vacina: a infecção deve ser limitada a seres humanos, sem reservatório animal; no caso de infecções virais, deve existir apenas uma ou poucas cepas do vírus e deve haver propriedades antigênicas constantes; o vírus não deve persistir no hospedeiro infectado; e deve haver uma vacina efetiva.

Em 1996 o número estimado de casos de varíola no mundo foi de 20 milhões. O último caso da doença foi anunciado em 1980.¹⁵ A poliomielite tornou-se o próximo alvo para erradicação, através da administração da vacina oral contra poliovírus. Esta tarefa é mais difícil porque a vacina é sensível ao calor, são necessárias várias doses, a vacina por se só pode induzir paralisia (embora muito raramente), e ao contrário da varíola, não existe teste simples para indicar que a vacinação teve sucesso. A poliomielite natural já foi eliminada das Américas, Europa, região do Pacífico ocidental, Sudeste da Ásia, porém serão levados alguns anos mais para alcançar a erradicação global.¹⁶

O sarampo é a infecção mais contagiosa para o homem e causa 30 por cento de todas as mortes devido a doenças imunopreveníveis. A interrupção com sucesso da transmissão da infecção do sarampo em países com taxas de cobertura vacinal muito altas é indicativa do progresso em direção a meta de eliminação do sarampo nas Américas.

O Programa Ampliado de Imunizações da Organização Mundial de Saúde (OMS) aumentou o nível de vacinação para controlar o tétano, a difteria, a coqueluche, a tuberculose, o sarampo e a poliomielite em países em desenvolvimento de 5 por cento em 1974 para uma média de 80 por cento na década de 1980, e deste então tem permanecido nesse nível. As metas de um novo grupo importante, a Aliança Global para Vacinas e Imunizações, são erradicar a poliomielite, aumentar a taxa de vacinação infantil para cerca de 90 por cento no mundo, e incluir nesta cobertura vacinas contra infecções por hepatite B e *H. influenzae* tipo b.

Um relatório de saúde no mundo da OMS em 1998¹⁸ declarou que ocorreram cerca de 5 bilhões de casos da doença e 6 milhões a 7 milhões de mortes anuais por diarreia infantil, incluindo aquelas devido a infecções por rotavírus,¹⁹ especialmente aquelas causadas por vírus respiratório sincicial.² As infecções por vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), tuberculose, e malária causam 7 milhões a 8 milhões de mortes anualmente, principalmente em países em desenvolvimento. A incidência de doenças sexualmente transmitidas em países desenvolvidos está constantemente aumentando.²⁰ A vacinação oferece a maior oportunidade para diminuir esse tributo. O propósito principal das vacinas atualmente disponíveis é induzir fortes respostas de anticorpo capazes de neutralizar a infectividade, porém a tentativa de desenvolver tipos tradicionais de vacinas contra muitas doenças importantes não tem obtido sucesso. Existe uma forte necessidade para novos tipos de vacinas que não apenas sejam mais potentes em geral, porém também induzam uma resposta humoral mais forte ou resposta imunológica mediada por célula.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA E O CONTROLE DE INFECÇÕES

Existem dois padrões de infecção. Todos os vírus e algumas bactérias e parasitas são agentes intracelulares que podem viver e replicar apenas no interior das células. Outros tipos de bactéria e parasitas existem e se replicam extracelularmente. Também, as infecções são agudas ou persistentes. As infecções são consideradas agudas quando uma dose subletal do agente é controlada e rapidamente eliminada pelo sistema imunológico; a maioria das vacinas atuais são direcionadas contra essas infecções. As infecções persistentes ocorrem quando o agente tem sucesso na evasão ou destruição dos elementos da resposta imunológica.

As funções de diferentes classes de anticorpos – IgM, IgE, IgA, e subclasses de IgG – no controle de infecções incluem a prevenção ou limitação da infecção inicial e subsequente viremia ou bacteremia e a morte de células infectadas por anticorpos de citotoxicidade dependente de célula ou lise mediada por complemento.²¹ No caso de infecções extracelulares, o anticorpo específico necessita de apoio de uma resposta forte pelas células CD4+ T auxiliar tipo 1.

Durante as infecções intracelulares, as respostas importantes das células T precedem a formação de níveis substanciais de anticorpos antimicrobianos. A seqüência de duas principais respostas, aquela das células T citotóxicas e a resposta de células que secretam anticorpo específico nos pulmões de ratos infectados por via intranasal com influenzavirus, é mostrada na Figura 2. A diminuição no nível de vírus infecciosos coincide com o aumento na atividade de células T citotóxicas.²² Nos seres humanos infectados com HIV-1, a diminuição nos níveis de vírus infecciosos no sangue também coincide com o surgimento de células T citotóxicas específicas ao vírus.^{23,24} Essas células T efectoras são primariamente responsáveis pelo controle e algumas vezes eliminação de muitas infecções intracelulares diferentes que têm sido documentados completamente com respeito a muitas infecções.

Células CD8 Restrita a Classe I + Células T Citotóxicas

Considerando que todos os tipos de células, exceto os gametas, neurônios, células vermelhas, e células do trofoblasto, expressam antígenos MHC classe I, a maioria das células infectadas devem ser reconhecidas pelas células T citotóxicas. As células infectadas tornam-se suscetíveis a lise por células T citotóxicas específicas como antes da liberação da progenia viral, permitindo uma janela de tempo para as células T efectoras procurar e destruir as células infectadas antes de surgir a progenia. Em adição a participação diretamente no limite das infecções pelas células assassinas infectadas, as células T citotóxicas secretam citotoxinas potentes com atividades antivirais e macrófagas, tais como o interferon- γ e fator α de necrose de tumor.

Existem quatro situações nas quais as pessoas que foram expostas ao HIV-1 porém não tratadas com agentes antivirais são negativas para o vírus e soronegativas porém apresentam células T citotóxicas + DC8 específicas ao HIV-1 ou interferon- γ produzido por tais células: as crianças nascidas de mães infectadas,^{25,26} parceiros por muito tempo de pessoas infectadas,^{27,28} mulheres africanas prostitutas há muito tempo,²⁹ e alguns trabalhadores da saúde que foram expostos uma vez ao vírus.³⁰ Além disso, a transferência de um soro anti-CD8 potente para macacos antes da infecção com vírus da imunodeficiência símia (SIV) e com brevidade depois disso causou um aumento extenso, transiente nos níveis virais³¹⁻³³ e uma diminuição nos níveis de CD4 + células T.³¹

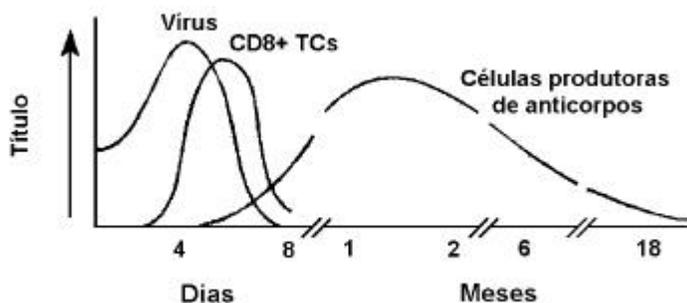


Figura 2. A Resposta Imunológica a infecção Intrasal com Influenzavírus.

Durante os primeiros dias após a inoculação de influenzavírus, o título de vírus infeccioso e os níveis de células T citotóxicas DC8+ (CTs) sobe). Aproximadamente quatro dias após a infecção, os níveis de células produzindo anticorpos inicia a ascensão. As células citotóxicas T aparecem antes das células produzirem anticorpos. A queda no título de vírus infeccioso coincide com o aumento na atividade de células T citotóxicas, que, por sua vez, diminui e

então desaparece dentro de poucos dias após o vírus infeccioso se tornar indetectável. Extensos números de células T citotóxicas de memória estão presentes em 2 e 6 semanas, e algumas estão ainda presentes aos 12 meses. As células que produzem IgM precedem o surgimento de células que produzem IgA e IgG por poucos dias, e estão presentes em números altos por cerca de 12 meses, após o que apenas as células produtoras de IgG são encontradas; existem achados de decréscimo firme dos números. Os números de células B de memória são mais altos aproximadamente 2 meses após a infecção, porém estas células persistem no baço por no mínimo 18 meses. Os dados são de Ada e Jone.

Imunidade Regional

As superfícies mucosas cobrem uma área maior que a da pele e são bem dotadas de tecido linfóide associado. À exceção da vagina, a qual é normalmente colonizada por cerca de seis diferentes bactérias que mantêm um meio ambiente hostil a colonização por outras bactérias. Existe um sistema mucoso comum de forma que a imunização em um local pode proporcionar proteção a outro local. Desta forma, a vacina contra adenovírus é administrada oralmente porém protege contra infecção do trato respiratório.³⁴ Em ratos e macacos, a imunização por meio do trato respiratório é um modo efetivo de induzir uma forte resposta no trato genital,³⁵ um achado relevante para desenvolver vacinas contra doenças sexualmente transmissíveis. A infecção ou vacinação de uma superfície mucosa não apenas induz a produção de IgA secretora como também induz a entrada de células T citotóxicas no local. Por exemplo, as células T citotóxicas específicas estão presentes em amostras obtidas com um esfregaço de cervix em algumas mulheres infectadas pelo HIV-1.³⁶

Evasão, Supressão e Subversão da Resposta Imunológica em Infecções Intracelulares

Os micróbios destróem a imunidade humoral principalmente pela variação da seqüência de antígenos de superfície.³⁷ Outras táticas incluem fraca imunogenicidade e epitopos inacessíveis nos antígenos de superfície reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes e formação de um complexo entre o micróbio e um anticorpo a fim de intensificar a probabilidade de células infectadas que expressam Fc ou receptores de complemento, tais como macrófagos. O HIV-1 usa todas essas estratégias.³⁸

Uma infecção persistente usualmente ocorre quando a resposta mediada por célula é suprimida ou destruída. O HIV-1 emprega todas as seguintes estratégias:³⁸ infecção latente; infecção de locais que são inacessíveis aos mecanismos de resposta imunológica; destruição de células CD4 + T; diminuição da regulação de expressão de moléculas MHC classe I; mutação, a qual muda a seqüência peptídica viral, imitando as células T efectoras existentes infectivas; e inibição da atividade das células T citotóxicas. A modelagem de uma vacina que destrua os subterfúgios do HIV-1 não será fácil, porém novas formas de tecnologia de vacinas podem superar as dificuldades.

NOVOS CAMINHOS PARA VACINAS

Produção de Antígenos e Anticorpos em Plantas Transgênicas

Antígenos virais e bacterianos têm sido produzidos em plantas transgênicas.^{39,40} O antígeno de superfície da hepatite B, a enterotoxina da *Escherichia coli*, a glicoproteína do vírus da raiva que têm sido produzidos em plantas transgênicas induzem anticorpos IgG com a especificidade antigênica correta após a administração oral em ratos. Uma vantagem potencial desde caminho inclui seu baixo custo e a habilidade de afetar a vacinação simplesmente tendo que uma pessoa comer uma parte selecionada da planta transgênica. Por exemplo, os ratos alimentados com tubérculo da batata contendo um ou mais antígenos estranhos tiveram IgA mucoso antígeno-específico e IgG no sangue. Os porcos alimentados com batatas transgênicas contendo a proteína protetora de vírus de transmissão gastroentérica tiveram uma redução significativa na morbidade e mortalidade quando enfrentaram o vírus infeccioso.

Em adição aos antígenos da vacina, os anticorpos específicos têm também sido feitos em plantas. Um anticorpo contra *Streptococcus mutans*, o qual contribui para a deterioração dentária, foi aplicado na limpeza de bocas de voluntários e preveniu recolonização da boca por essas bactérias por quatro meses.⁴¹ Muitos desses anticorpos atualmente estão disponíveis.⁴²

Imunização Transcutânea

A imunização transcutânea envolve a aplicação de um antígeno com um adjuvante, freqüentemente toxina da cólera, na pele intacta, pré-lavada para facilitar a penetração.⁴³ Em ratos, os reagentes entram na epiderme, onde eles entram em contato e são carregados pelas células de Langerhans, uma classe de células dendríticas. Durante sua migração através da derme por meio dos linfáticos aferentes e daí para os linfonodos de drenagem, eles contatam e ativam as células T, então iniciam uma forte resposta de anticorpo aos antígenos como o toxóide diftérico.

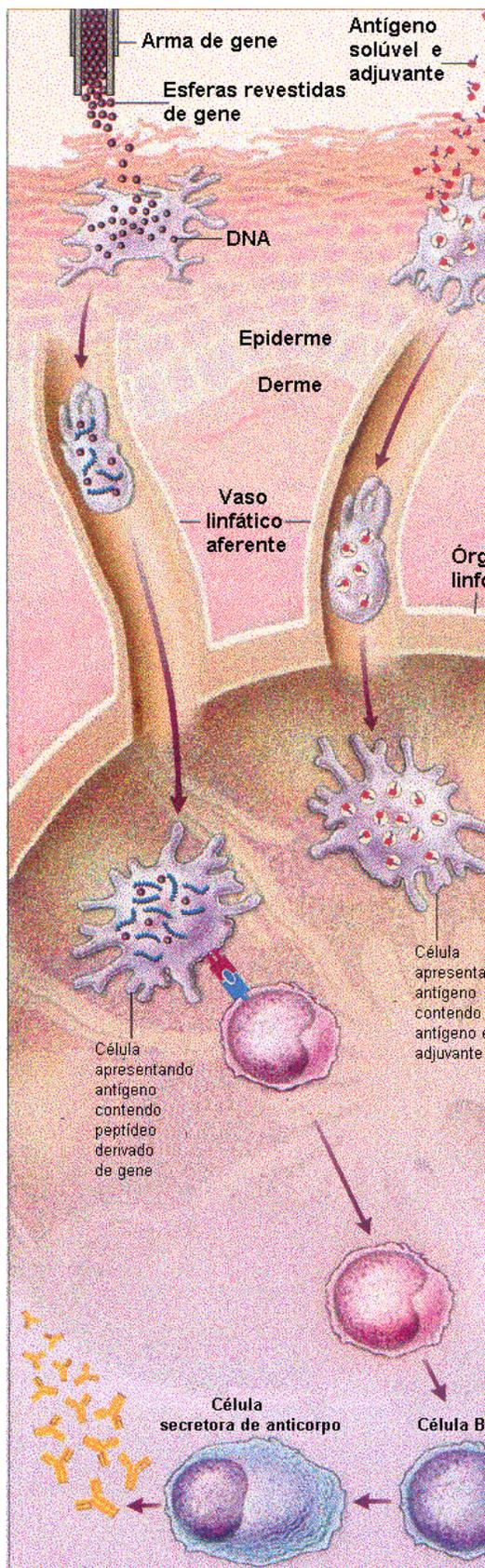
DESENVOLVIMENTO DE VACINA

Peptídeos, Subunidades e Adjuvantes

O uso de peptídeos, os quais são apenas partes de um antígeno, como vacinas tem muitas vantagens e algumas desvantagens.¹ As vantagens incluem o fato de que o produto é quimicamente definido, estável, e seguro e contém apenas epitopos importantes de célula B e célula T. As desvantagens incluem dificuldade em imitar a conformação dos polímeros antígenos encontrados com muitos vírus, o fato de que os epitopos de célula B reconhecidas pelos anticorpos neutralizantes são algumas vezes seqüências descontínuas, e a suscetibilidade dos peptídeos para proteólise. Várias administrações, usualmente com um adjuvante, podem ser necessárias. A conjugação de epitopos peptídeos a um carreador de proteína, como um toxóide, pode melhorar a produção de anticorpos. A primeira amostra de vacina peptídica, composta de seqüências de proteínas do plasmodium, revelou resultados desapontadores em crianças jovens onde a malária é endêmica.⁴⁴ Epitopos de células citotóxicas T podem se unir a moléculas MHC classe I nas células dendríticas. Considerando que as células dendríticas também expressam moléculas co-estimulantes, elas podem diretamente reagir com uma simples célula T + CD4 ativada. Este caminho está sendo usado na imunoterapia do câncer, como descrita abaixo.

As vacinas de sub-unidades são freqüentemente feitas com o uso de tecnologia de DNA recombinante. A imunogenicidade pode ser realçada e a resposta imunológica

direcionada para induzir as respostas mediadas por célula e humoral através da formação de agregados como complexos imunológicos não estimulantes, partículas semelhantes ao vírus, cápsula de antígeno, ou antígeno lipídico encapsulado sob várias condições.⁴⁵⁻⁴⁸ Os agregados de peptídeos relacionados também estão sendo testados.



Por exemplo, as preparações em avaliação em testes clínicos incluem polímeros de peptídeos relacionados do grupo streptococcus A como uma vacina contra febre reumática⁴⁹ e um polímero peptídico do plasmodium que também contém um lipopeptídeo para facilitar interações entre as células e assim induzir uma resposta imunológica forte contra malária.⁵⁰

Os tipos mais simples de vacinas são frequentemente administrados com adjuvantes para intensificar sua imunogenicidade. O alúmen, o adjuvante mais

frequentemente utilizado, retarda a liberação de um antígeno como o da vacina contra a hepatite B e intensifica a produção de anticorpos. A faixa de outros produtos é muito ampla. Alguns estão sendo testados em humanos.⁵¹ Dois adjuvantes, o alúmen e o QS21, têm aumentado muito a produção de anticorpos em testes clínicos de fase 1 de uma vacina contra malária.⁵²

Vacinas de Agentes Vivos como Vetores de Outros Antígenos de Vacina

Existe um amplo interesse no uso de vacinas compostas por vírus atenuado ou bactérias como carreadores (vetores) de outros antígenos.⁵³ Técnicas para incorporação da codificação do DNA de um antígeno de outro agente infeccioso no vírus vacinal foram primeiramente descritas em 1982.^{54,55} Uma célula infectante ou um animal com o vírus quimérico da varicela, o antígeno codificado por um DNA estranho foi manifestado e o animal foi protegido da infecção pela doador do DNA estranho.

Mais de 20 DNA e RNA de vírus como também bactérias são usadas experimentalmente como vetores. Os candidatas liderantes incluem o poxvirus,

Tradução: Edson Alves de Moura Filho
e-mail: edson.moura@saude.gov.br

especialmente a cepa altamente atenuada Ankara, como também fowlpox e canaripox, os quais infectam porém não se replicam em células humanas.^{56,57} Considerando que aproximadamente 10 por cento do mais extenso genoma do poxvirus pode ser substituído por DNA estranho, esses vetores têm o potencial de se tornarem vacinas multivalentes. O adenovírus e *Sal. Typhi* pode ser usado como vetores se uma resposta mucosa for desejada.⁵⁸

Uma maior dimensão foi adicionada a este caminho pela incorporação da codificação interleucina-2 de DNA em um vetor poxvirus quimérico^{59,60} As citocinas usadas desta maneira permitem que a resposta imunológica seja canalizada para induzir uma forte resposta humoral ou uma forte resposta imunológica mediada por célula. Este caminho tem problemas potenciais, entretanto. A infecção com interleucina-4 do mousepox (vírus da ectromelia) causou alta taxa de mortalidade em ratos que eram geneticamente resistentes a infecção por ectromelia. Mesmo imunizados, os ratos resistente infectados com a interleucina-4 da ectromelia tiveram uma taxa de mortalidade substancial.⁶¹

Imunização com DNA

Notavelmente, o DNA que codifica antígenos estranhos podem ser inseridos juntos com um fomentador adequado na bactéria plasmídica. A infecção intramuscular desse complexo induz uma resposta imunológica ao antígeno codificado pelo DNA em ratos. Além disso, a resposta é muito forte, considerando que o DNA bacteriano, diferente do DNA de vertebrados, é reconhecida como estranha pelos vertebrados por causa de seu alto conteúdo de composições CpG não metiladas^{62,63} - ou seja, GACGTT no caso de raros e GTCGTT no caso de humanos. Tais composições, quando reconhecidas por uma proteína mamífera que é expressa por células diferentes do sistema imunológico inato, simula a produção, ativação e maturação de células dendríticas. Estas células, por sua vez, preferencialmente induzem uma resposta Th1, a qual controla muitas infecções bacterianas intracelulares. Os preparados de composições CpG são também efetivos quando dados por via mucosa. Testes clínicos dessas vacinas estão em progresso.

Alternativamente, um número relativamente pequeno de plasmídeos, absorvidos a minúsculas pérolas, são destruídas através da pele por um “gene caçador”. Alguns entram nas células dendríticas (Langerhans) diretamente, aparentemente por via secundária e induzindo, em raros, uma resposta de viés em direção a ativação das células tipo 2 helper T (Th2) e, desta forma, a produção de anticorpo (Fig. 3). Entretanto, em macacos, o início da resposta imunológica pela administração de DNA com um gene caçador seguido por reforço de resposta pela administração de um vetor quimérico vivo, gera uma forte resposta de Yh1.^{56,57}

Este caminho tem muitas vantagens potenciais, incluindo seu baixo custo, estabilidade e ausência de infectividade (embora a resposta imunológica seja semelhante àquela vista após a infecção natural), junto com o fato de que a presença de anticorpo contra o antígeno que será expresso não inibe a resposta. A desvantagem potencial inclui a integração de DNA no genoma da célula hospedeira, a qual pode resultar na transformação de eventos tumorais, e a formação de anticorpos anti-DNA. Tais eventos ainda não foram observados.

Imunização Sequencial

Tradicionalmente, a imunização é repetida, e o mesmo preparado é dado a cada vez. Porém quando os ratos foram imunizados com um preparado de DNA quimérico e

após receberam um reforço de varicela quimérica expressando o mesmo antígeno estranho (hemaglutinina da influenza), os títulos de antihemaglutinina foram cerca de 50 vezes tão altos como aqueles encontrados após duas injeções do mesmo preparado.⁶⁵ A validade desse “primeiro reforço” tem sido confirmado e extensivo. Pela resposta de imunidade primária com a administração de DNA e reforço da resposta com a administração da cepa Ankara altamente atenuada do vírus vacinal – com cada preparado contendo epitopos de célula-T de antígenos HIV-1⁶⁶ ou de esporozoítos de plasmódio⁶⁷ – níveis muito altos de CD8+células citotóxicas T foram induzidas em ratos⁶⁸ e em macacos no caso do HIV-1.⁶⁹ No experimento da malária, os ratos foram completamente protegidos contra uma provocação com *Plasmodium berghei*. Em contraste, a primo-resposta com a administração de vírus quimérico da varíola e reforço da resposta com a administração de DNA foram relativamente ineficientes.

Os macacos imunizados de acordo com o protocolo de DNA-varíola quimérico HIV-1-específico ou SIV-específico, os quais induziu fortes respostas de anticorpos mediados por célula porém não protetores, foram protegidos contra infecção persistente quando provocados posteriores com HIV-1⁵⁶ ou um SIV patógeno. Similarmente, os macacos imunizados de acordo com um protocolo de DNA-Ankara (vaccinia) SIV-específico foram protegidos contra infecção persistente após a provocação mucosa.⁷⁰

Em outros experimentos bem sucedidos em macacos, o adenovírus quimérico tem sido usado como imunização de reforço após uma primo-imunização com composição DNA.⁷¹ Os macacos imunizados com um produto quimérico de DNA que receberam combinação protéica de interleucina-2-imunoglobulina como reforço foram similarmente protegidos contra uma provocação com um SIV altamente patógeno.⁷² Os testes clínicos atualmente em progresso estabelecerão se esses protocolos DNA-poxvírus diferentes induzem fortes respostas de células T citotóxicas, enquanto a resposta persistir, e se existe transmissão reduzida do vírus e proteção duradoura contra o desenvolvimento de síndrome da imunodeficiência adquirida em indivíduos sob risco. Estes resultados também fornecem uma conjectura robusta para iniciar terapia anti-retroviral em pessoas que tenham recentemente sido infectadas com HIV e, uma vez os títulos virais sejam minimizados, vaciná-los para induzir uma forte resposta contínua mediada por célula.⁷³ Este caminho poderia permitir a descontinuidade de terapia com droga por longos períodos.

Um caminho similar promete controlar infecções com o vírus Ebola. Os macacos imunizados com DNA quimérico seguido por adenovírus quimérico, cada contendo código de DNA para antígenos do vírus Ebola, têm estado protegido da doença após provocação com uma dose normalmente letal do vírus.⁵⁸ Os resultados estimulantes têm sido obtidos com o uso do modo primo-reforço em ratos com tuberculose.⁷⁴

O FUTURO DA VACINAÇÃO

Doenças Infeciosas

Embora as vacinas sejam urgentemente necessárias contra muitas viroses, o HIV-1 e um vírus influenza recombinante recentemente emergente apresenta uma ameaça maior.⁷⁵ No caso do HIV-1⁷⁶ e influenzavírus,⁷⁷ pode ainda ser possível induzir uma resposta de anticorpo amplamente neutralizante. Porém se o protocolo de primo-reforço para vacinação contra a infecção por HIV-1, malária, e infecção pelo vírus Ebola induz resposta de célula T citotóxica forte, persistente contra o HIV-1 em

humanos, o mesmo caminho poderá ser aplicado a muitas outras viroses, incluindo a influenza pandêmica.

As seqüências completas de DNA de muitas bactérias, incluindo o *Mycobacterium tuberculosis* e *Chlamidia trachomatis*, são desconhecidas, e as da *Leishmania major* e *Plasmodium falciparum* estão sendo decifradas.⁷⁸ O conhecimento das seqüências devem fornecer um catálogo dos genes que codificam para cada fator de virulência e de imunógenos potenciais, como um alvo para anticorpos neutralizantes, com base em suas características estruturais, ou como uma fonte de epitopos de células T para classe I e II regionais comuns de alelos HLA. Como exemplo, alguma bactéria tem sido encontrada contendo um código genético de DNA adenina metilase. As salmonellas que carecem desse gene são muito menos virulentas porém ainda induzem uma forte resposta imunológica.⁷⁹

Doenças não transmissíveis

Doenças autoimunes

A alta prevalência de déficits graves de saúde resultante de autoimunidade têm induzido interesse em uma forma “negativa” de vacinação, que previne ou abole uma resposta imunológica particular. Em modelos animais de autoimunidade, este caminho tem prevenido algumas formas da doença.⁸⁰ Estudos em humanos incluem administração via mucosa de mielina em esclerose múltipla, colágeno tipo 2 em artrite reumatóide, antígeno de retina em uveítes, e insulina em diabetes tipo 1. Os resultados desses estudos têm sido equívocos na melhor das hipóteses e são principalmente desapontadores.⁸¹ A resposta pode encontrar-se na capacidade de identificar pessoas que estejam sob alto risco genético ou que estejam em estágios precoces de doenças autoimunes, um momento quando a tolerância poderá ser alcançada mais facilmente.

Câncer

Existem dois tipos de câncer do ponto de vista da vacina. Um tipo está associado com uma infecção viral, como um carcinoma hepatocelular primária, o qual é devido a infecção pelo vírus da hepatite B; sarcoma de Kaposi, o qual está associado com infecção pelo herpesvírus; linfoma de célula B, o qual está relacionado a infecção pelo HIV-1; carcinomas genital e de células escamosas, os quais estão associados com infecção pelo papilomavírus; linfoma de Burkitt e carcinoma nasofaríngeo, os quais estão relacionados a infecção pelo vírus Epstein-Barr; e leucemia de célula T adultas, a qual está relacionada a infecção pelo vírus linfotrópico de célula T humana tipos I e II. Os outros tipos de câncer sensíveis a vacinas inclui tumores espontâneos como melanoma que libera antígenos endógenos do tumor.

No caso do primeiro tipo, a vacinação contra o vírus relevante deve prevenir a gênese do tumor. Achados com relação ao vírus da hepatite B e carcinoma hepatocelular primário são muito estimulantes. A vacinação de crianças em Taiwan com a vacina contra hepatite B tem reduzido a incidência subsequente de carcinoma hepatocelular primário entre crianças de 6 a 14 anos de idade em 50 por cento e a incidência de morte por câncer em 70 por cento.⁸² Em outro estudo, a administração de um preparado consistindo de partículas semelhantes ao vírus contendo o antígeno L1 de cepas do papilomavírus 6 e 11 induziu forte resposta imunológica, e existiu regressão completa das verrugas genitais em 22 de 33 indivíduos.⁸³ Testes clínicos de vacinas contra a proteína E7 transformante de várias cepas de papilomavírus que causam câncer estão em andamento nos Estados Unidos.

A imunoterapia direcionada contra um tumor estabelecido apresenta um problema mais difícil, porém atualmente existem áreas de otimismo. Muitos antígenos associados a tumores têm sido identificados em melanomas. Em vários testes clínicos pequenos nos quais as células T citotóxicas antígeno-específicas ao tumor foram geradas por diferentes protocolos de vacinação, a remissão completa ou parcial do tumor foi alcançada em cerca de 30 por cento dos pacientes.^{84,85} O objetivo agora é aumentar esta taxa através da exploração de diferentes modos de geração de respostas persistentes e muito fortes de células T citotóxicas contra vários antígenos associados a tumor. A vacinação com células dendríticas que têm sido derivadas de um paciente e carregada com células alogeneicas mortas de melanoma parece promissor.⁸⁶ A imunização de mulheres HLA-A2-positivas com câncer de pulmão que secreta HER-2/*neu* com um polipeptídeo antígeno-específico contendo epitopos de célula T CD4+ e CD8+ e de especificidades adequadas a HLA produziram respostas de células T CD4+ e CD8+; as últimas células foram capazes de lisar as células tumorais.⁸⁷

Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é o resultado da formação de uma pequena proteína mutante, amilóide **b** peptídeo (A β ₄₂). A deposição desta proteína na forma de placas neurotóxicas no cérebro de pessoas com doença de Alzheimer causa perda de função mental. Os ratos transgênicos que secretam DNA que codifica esta proteína fornece um excelente modelo, considerando que estes ratos têm placas cerebrais e muitas das anormalidades celulares vistas em pacientes com doença de Alzheimer. A imunização precoce desses ratos com amilóide **b** preveniu a formação de placas e a subsequente degeneração celular. Mesmo mais notável, a maior parte da degeneração celular desapareceu se a vacina foi administrada após a formação das placas.⁸⁸ Outros estudos mostraram que se a vacina foi administrada antes das placas se formarem, por outro lado a perda de memória inevitável foi prevenida.⁸⁹ A administração nasal por tempo prolongado de proteína em ratos também induziu a síntese de citocinas antiinflamatórias no cérebro e a formação de anticorpos.⁹⁰ Estes resultados fortalecem a conjectura para o acúmulo de amilóide **b** como a causa da demência na doença de Alzheimer.^{91,92}

Usando um microscópio multifóton altamente sensível, os pesquisadores observaram imagens firmemente focadas de placas nos cérebros de ratos transgênicos vivos; foi a primeira vez que essas placas foram observadas em hospedeiro vivo.⁹³ Eles primeiro marcaram um anticorpo específico monoclonal para amilóide **b** com fluoresceína e então o aplicaram in vivo ao córtex, revelando numerosos depósitos de amilóide **b**. Três dias após, havia elevação da organização da micróglia e a maior parte das placas tinham desaparecido. Estes achados oferecem a esperança de que uma combinação de vacinação com o peptídeo amilóide **b** e imunoterapia com um anticorpo monoclonal humanizado abrandará e talvez mesmo reverter as anormalidades causadas pela doença de Alzheimer.

CONCLUSÕES

O marcante sucesso de muitas vacinas, especialmente aquelas administradas em crianças e seus impressionantes registros de segurança, juntamente com a erradicação da varíola, são considerados entre os maiores feitos históricos da saúde pública do século XX. Porém existem ainda muitas doenças graves causadas por patógenos que escapam ou corrompem o controle por uma resposta imunológica humoral-específica ou mediada por célula. Um protocolo de imunização envolvendo um modo de primo-reforço (normalmente DNA seguido por um vetor de vírus vivo quimérico) tem induzido fortes

respostas de células T citotóxicas que preveniram a infecção persistente em ratos e macacos após a provocação com HIV-1 e outros patógenos humanos graves, incluindo o vírus Ebola e plasmódio. O sucesso dos testes clínicos atuais de vacinação contra HIV-1 com o uso desse protocolo sinalizará uma alteração no paradigma do desenvolvimento de vacinas. O sequenciamento do genoma de muitas bactérias é também uma importante etapa avançada. Os esforços para usar a vacinação e técnicas de imunoterapia para combater as doenças não transmissíveis, especialmente o câncer e doença de Alzheimer, estão também expandindo nossos horizontes. Os alcances do século XXI pode ser tão espetaculares como aqueles do século XX.

Agradeço aos vários colegas por seus proveitosos comentários.

REFERÊNCIAS

1. Ada GL, Ramsay AJ. Vaccines, vaccination, and the immune response. Philadelphia: Lippincott – Raven, 1997.
2. Division of Microbiology and Infectious Diseases. Accelerated development of vaccines: the Jordan Report, 2000. Washington, D.C.: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, 2000.
3. Lucas AH, Granoff D M. Imperfect memory and the development of *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:235-9.
4. Summary of notifiable diseases, United States, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998;47:Suppl:1-92.
5. Ramsay ME, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 2001;357:195-6.
6. Lin YC, Ho VA, Khiem HB, et al. The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 2001;344:1263-9.
7. Egea E, Iglesias A, Salazar M, et al. The cellular basis for lack of antibody responses to hepatitis B vaccine in humans. *J Exp Med* 1991;173:531-8.
8. Begg N, Cutts T. The role of epidemiology in the development of a vaccination programme. In: Cutts T, Smith PG, eds. *Vaccination and world health*. Chichester, England: John Wiley, 1995:123-38.
9. Murphy TV, Gargiullo PM, Massoudi MS, et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2001;344:564-72.
10. Weibel RE, Caserta V, Benor DE, Evans G. Acute encephalopathy followed by permanent brain injury or death associated with further attenuated measles vaccines: a review of claims submitted to the National Vaccine Injury Compensation Program. *Pediatrics* 1998;101:383-7.
11. Levin A. Vaccines today. *Ann Intern Med* 2000;133:661-4.
12. Wakefield AJ, Murch SH, Anthony A, et al. Ileal-lymphoid-nodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet* 1998;351:637-41.
13. Amin J, Wong M. Measles-mumps-rubella immunisation, autism and inflammatory bowel disease: update. *Commun Dis Intell* 1999;23:222.
14. Elliman D, Bedford H. MMR vaccine: the continuing saga. *BMJ* 2001;322:183-4.
15. Fenner, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. *Smallpox and its eradication*. Geneva: World Health Organization, 1988.
16. Progress towards poliomyelitis eradication: WHO eastern Mediterranean region. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75:371-6.

17. Global Alliance for Vaccines and Immunization. Immunization focus. Geneva: United Nations Preparatory Educational, Scientific, and Cultural Organization, November 2000:1-9.
18. The world health report 1998 — life in the 21st century: a vision for all. Geneva: World Health Organization, 1998.
19. Glass RI, Gentsch J, Smith JC. Rotavirus vaccines: success by reassortment. *Science* 1994;265:1389-91.
20. Gerbase AC, Rowley JT, Mertens TE. Global epidemiology of sexually transmitted diseases. *Lancet* 1998;351: Suppl 3:2-4.
21. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
22. Ada GL, Jones PD. The immune response to influenza infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;128:1-54.
23. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, et al. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 1994;68:4650-5.
24. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1994;68:6103-10.
25. Rowland - Jones SL, Nixon DF, Aldhous MC, et al. HIV - specific CTL activity in an HIV - exposed but uninfected infant. *Lancet* 1993;341:860-1.
26. Cheynier R, Langlade - Demoyen P, Marescot MR, et al. Cytotoxic T lymphocyte responses in the peripheral blood of children born to human immunodeficiency virus-1-infected mothers. *Eur J Immunol* 1992;22:2211-7.
27. Langlade - Demoyen P, Ngo – Giang - Huong N, Ferchal , Oksenhendler E. Human immunodeficiency virus (HIV) nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J Clin Invest* 1994;93:1293-7.
28. Biasin M, Caputo SL, Speciale L, et al. Mucosal and systemic immune activation is present in human immunodeficiency virus-exposed seronegative women. *J Infect Dis* 2000;182:1365-74.
29. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* 1995;1:59-64.
30. Pinto LA, Sullivan J, Berzofsky JA, et al. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J Clin Invest* 1995;96:867-76.
31. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol* 1998;72:164-9.
32. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, et al. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+)T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med* 1999;189:991-8.
33. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, et al. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+lymphocytes. *Science* 1999;283:857-60.
34. Gaydos CA, Gaydos JC. Adenovirus vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, eds. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999:609-18.
35. Imaoka K, Miller CJ, Kubota M, et al. Nasal immunization of nonhuman primates with simian immunodeficiency virus p55 gag and cholera toxin adjuvant induces Th1/Th2 help for virus-specific immune responses in reproductive tissues. *J Immunol* 1998;161:5952-8.
36. Musey L, Hu Y, Eckert L, Christensen M, Karchmer T, McElrath MJ. HIV-1 induces cytotoxic T lymphocytes in the cervix of infected women. *J Exp Med* 1997;185:293-303.

37. Webster RG. Influenza viruses: general features. In: Webster RG, Granoff A, eds. Encyclopedia of virology. New York: Academic Press, 1994:709-13.
38. McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Cellular immune responses to HIV. Nature 2001;410:980-7.
39. Hammond J, McGarvey P, Yusibov V, eds. Plant biotechnology: new products and applications. Curr Top Microbiol Immunol 1999;240:1-196.
40. Yusibov V, Shivprasad S, Turpen TH, Dawson W, Koprowski H. Plant viral vectors based on tobamoviruses. Curr Top Microbiol Immunol 1999;240:81-94.
41. Ma JK - C, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. Nat Med 1998;4:601-6.
42. Kwiatkowski D. Science, medicine, and the future: susceptibility to infection. BMJ 2000;321:1061-5.
43. Glenn GM, Scharon-Kerston T, Alving CR. Advances in vaccine delivery: transcutaneous immunization. Expert Opin Invest Drugs 1999;8:797-805.
44. D'Alessandro U, Leach A, Drakeley CJ, et al. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambian infants. Lancet 1995;346:462-7.
45. Jones PD, Tha Hla R, Morein B, Lovgren K, Ada GL. Cellular immune responses in the murine lung to local immunization with influenza A virus glycoproteins in micelles and immunostimulation complexes (ISCOMS). Scand J Immunol 1988;27:645-52.
46. Kovacovics-Bankowski M, Clark K, Benacerraf B, Rock KL. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A 1993;90:4942-6.
47. Bachmann MF, Kundig TM, Freer G, et al. Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins. Eur J Immunol 1994;24:2228-36.
48. Zhou, Rouse BT, Huang L. Induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo with protein antigen entrapped in membranous vehicles. J Immunol 1992;149:1599-604.
49. Brandt ER, Sriprakash KS, Hobb RI, et al. New multi-determinant strategy for a group A streptococcal vaccine designed for the Australian aboriginal population. Nat Med 2000;6:455-9.
50. Nardin EH, Oliveira GA, Calvo-Calle JM, et al. Synthetic malaria peptide vaccine elicits high levels of antibodies in vaccinees of defined HLA genotypes. J Infect Dis 2000;182:1486-96.
51. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. Vaccine 2001;19:2673-80.
52. Nardin EH, Calvo-Calle JM, Oliveira GA, et al. A wholly synthetic polyoxime malaria vaccine containing *Plasmodium falciparum* B cell and universal T cell epitopes elicits immune responses in volunteers of diverse HLA types. J Immunol 2001;166:481-9.
53. Brown F, ed. Recombinant vectors in vaccine development. Vol. 82 of Developments in biological standardization. Basel, Switzerland: Karger, 1994.
54. Mackett M, Smith GL, Moss B. Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:7415-9.
55. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A 1982;79:4927-31.
56. Kent SJ, Zhao A, Best SJ, Chandler JD, Boyle DB, Ramshaw IA. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. J Virol 1998;72:10180-8.
57. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, et al. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. Nat Med 1999;5:526-34.

58. Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, Yang ZY, Nabel GJ. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 2000; 408:605-9.
59. Flexner H, Hugin A, Moss B. Prevention of vaccinia virus infection in immunodeficient mice by vector-directed IL-2 expression. *Nature* 1987;330:259-62.
60. Ramshaw IA, Andrew ME, Phillips SM, Boyle DB, Coupar BE. Recovery of immunodeficient mice from a vaccinia virus/IL-2 recombinant infection. *Nature* 1987;329:545-6.
61. Jackson RJ, Ramsay AJ, Christensen CD, Beaton S, Hall DF, Ramshaw IA. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *J Virol* 2001;75:1205-10.
62. McDonnell WM, Askari FK. DNA vaccines. *N Engl J Med* 1996;334:42-5.
63. Krieg AM, Wagner H. Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 2000;21:521-6.
64. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9305-10.
65. Modlin RL. A toll for DNA vaccines. *Nature* 2000;408:659-60.
66. Leong KH, Ramsay AJ, Morin MJ, et al. Generation of enhanced immune responses by consecutive immunisation with DNA and recombinant fowlpox virus. In: Brown Chanock R, Ginsberg H, Norrby E, eds. *Vaccines 95*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995:327-31.
67. Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, et al. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine* 1998;16:439-45.
68. Schneider J, Gilbert SC, Blanchard TJ, et al. Enhanced immunogenicity for CD8+T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat Med* 1998;4:397-402.
69. Allen TM, Vogel TU, Fuller DH, et al. Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J Immunol* 2000;164:4968-78.
70. Amara RR, Villinger, Altman JD, et al. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* 2001;292:69-74.
71. Cohen J. Merck reemerges with a bold AIDS vaccine effort. *Science* 2001;292:24-5.
72. Barouch DH, Santra S, Schmitz JE, et al. Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* 2000;290:486-92.
73. Walker BD, Rosenberg ES. Containing HIV after infection. *Nat Med* 2000;6:1094-5.
74. McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AVS. Enhanced immunogenicity of CD4(+)T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun* 2001;69:681-6.
75. Ada G. HIV and pandemic influenza virus: two great infectious disease challenges. *Virology* 2000;268:227-30.
76. Nabel GJ. Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* 2001;410:1002-7.
77. Neiryneck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999;5:1157-63.
78. Moxon ER. Applications of molecular microbiology to vaccinology. *Lancet* 1997;350:1240-4.
79. Enserink M. Gene may promise new route to potent vaccines. *Science* 1999;284:883.

80. aria AMC, Weiner HL. Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol* 1999;73:153-264.
81. Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001;344:655-64.
82. Chang MH, Chen CJ, Lai MS, et al. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N Engl J Med* 1997;336:1855-9.
83. Zhang LF, Zhou J, Chen S, et al. HVP6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 2000;18:1051-8.
84. Nestle O, Alijagic S, Gilliet M, et al. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumour lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 1998; 4:328-32.
85. Timmerman JM, Levy R. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 1999;50:507-29.
86. Berard, Blanco P, Davoust J, et al. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J Exp Med* 2000;192:1535-43.
87. Knutson KL, Schiffman K, Disis ML. Immunization with a HER-2/neu helper peptide vaccine generates HER-2/neu CD8 T-cell immunity in cancer patients. *J Clin Invest* 2001;107:477-84.
88. Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid-*b* attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999;400:173-7.
89. Morgan D, Diamond DM, Gottschall PE, et al. A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature* 2000;408:982-5.
90. Weiner HL, Lemere CA, Maron R, et al. Nasal administration of amyloid-*b* peptide decreases cerebral amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 2000;48:567-79.
91. Butcher J. Alzheimer's amyloid hypothesis gains support. *Lancet* 2000;356:2161.
92. Helmuth L. Further progress on a *b*-amyloid vaccine. *Science* 2000; 289:375.
93. Bacskai BJ, Kajdasz ST, Christie RH, et al. Imaging of amyloid-*b* deposits in brains of living mice permits direct observation of clearance of plaques with immunotherapy. *Nat Med* 2001;7:369-72.

**Este documento traduzido trata-se de uma contribuição da Coordenação
Geral do Programa Nacional de Imunizações –
CGPNI/CENEPI/FUNASA/MS, a todos que se dedicam às ações de
imunizações.**